



⑮ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 198 23 454 A 1**

⑰ Aktenzeichen: 198 23 454.6
⑱ Anmeldetag: 18. 5. 98
⑲ Offenlegungstag: 25. 11. 99

⑤ Int. Cl.⁶:
C 07 H 21/04
C 07 H 1/00
C 07 B 61/00
C 07 K 1/04
C 07 K 1/06
C 12 N 15/10
G 03 F 1/00
G 03 F 7/20

DE 198 23 454 A 1

⑦ Anmelder:
Epigenomics GmbH, 10435 Berlin, DE

⑧ Vertreter:
Schubert, K., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anw.,
10119 Berlin

⑫ Erfinder:
Heuermann, Arno Svend, Dipl.-Ing., 13359 Berlin,
DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

⑤ Verfahren zur photolithographischen Herstellung von DNA, PNA und Protein Chips

DE 198 23 454 A 1

DE 198 23 454 A 1

1

Beschreibung

Stand der Technik

Als DNA-Chips werden Oberflächen bezeichnet, welche auf kleinster Fläche eine große Anzahl verschiedener DNA Moleküle fixiert oder synthetisiert werden. Von jedem beliebigen Punkt eines solchen Chips ist in der Regel bekannt, welche DNA sich an diesem befindet. Eine wichtige Klasse dieser Chips ist dadurch gekennzeichnet, daß kurze Sequenzen, sogenannte Oligonukleotide in situ auf der Chip-Oberfläche synthetisiert werden. Dadurch wird die Zahl der notwendigen chemischen Reaktionsschritte, die anderenfalls zur Synthese riesiger Zahlen von verschiedenen Sequenzen notwendig wären erheblich eingeschränkt.

DNA-Chips können auf mehrere Arten hergestellt werden. Die einfachste aber teuerste und aufwendigste ist das Aufbringen vorher synthetisierter Moleküle mittels Pipettieranlagen. Solche Methoden werden in Zukunft wahrscheinlich nicht konkurrenzfähig sein.

Methoden, die sich die oben genannten Vorteile der in situ Synthese zunutze machen lassen sich in rein chemische und photolithographische Verfahren unterteilen. Chemische Verfahren beruhen auf dem Aufbringen der zur Oligonukleotidsynthese notwendigen Lösungen mittels aufwendiger Pipettieranlagen. Daher sind diese zwar einer konventionellen (nicht in situ) Synthese hinsichtlich Geschwindigkeit und Kosteneffizienz überlegen, können aber bei weitem nicht mit den Möglichkeiten der photolithographischen Synthesen konkurrieren.

Für die chemische Synthese von Oligonukleotiden werden Nukleotidbausteine eingesetzt, welche zwei Arten von Schutzgruppen tragen. Einerseits solche Schutzgruppen, die Funktionalitäten der Basen schützen, und andererseits eine anders geartete Schutzgruppe, welche lediglich die Kettenverlängerung um einen einzigen Baustein zuläßt. Die Abspaltung, dieser letzten Schutzgruppe ist wesentlich für die in situ Synthese. Es müssen an extrem vielen Punkten einer Matrix spezifisch Schutzgruppen quantitativ abgespalten werden, ohne an den anderen Punkten eine solche Abspaltung zu verursachen. Chemische Methoden stoßen dabei sehr schnell an die Grenze der Auflösung der Pipettiersysteme. Die einzelnen Tropfen, die aufgetragen werden sind zu groß und überlappen ab einer bestimmten Dichte.

Daher werden für DNA-Chips hoher Dichte heute photolithographische Synthesewege gewählt. Dabei sind die Schutzgruppen der Nukleotidbausteine photochemisch abspaltbar. Durch Bestrahlung einzelner Punkte der Synthesefläche kann die Kettenverlängerung spezifisch nur an diesen Punkten ausgelöst werden. Zwei Wege sind gangbar eine große Auflösung und damit Belegungsdichte auf solchen Oberflächen zu erreichen. Zum einen wird jeder einzelne Punkt einer Oberfläche einzeln mit einem Lichtstrahl – zum Beispiel einem Laser – angesteuert und so die Schutzgruppen der Nukleotidketten nur an den angestrahlten Punkten entschützt werden. Die notwendige Bestrahlungsdauer ist aber so lang, daß diese Verfahren noch zu zeitaufwendig sind. Außerdem wird DNA durch Laserbeschuß zerstört. Die möglicherweise Zehntausende von Punkten müssen nacheinander angesteuert werden. Möglich wären auch komplexe zum Beispiel Spiegelmechanismen, welche viele Punkte gleichzeitig ansteuern. Solche Vorrichtungen sind aber zur Zeit nicht erhältlich.

Die zweite und heute gebräuchlichste Methode ist es, Masken zwischen der Chip-Oberfläche und einer Lichtquelle zu installieren. In jedem Syntheseschritt wird so das Licht der Lichtquelle nur an den Punkten zur Chip-Oberfläche durchgelassen, an denen eine Entschützung stattfinden

2

soll. Daher können praktisch beliebig viele Reaktionen parallel durchgeführt werden. Bei vier Nukleotidbausteinen müssen also für eine Verlängerung aller Oligonukleotide um ein Nukleotid vier verschiedene Masken sequentiell über der Oberfläche positioniert werden. Um also eine Länge aller Oligonukleotide von zum Beispiel 30 Nukleotideinheiten zu erreichen müssen 120 Masken hergestellt werden und nacheinander extrem genau über der Oberfläche positioniert werden.

Nachteile des Standes der Technik

Je größer die Auflösung des Chips, desto schwieriger ist die Positionierung der Masken über der Oberfläche. Extrem aufwendige Technologie ist dafür erforderlich.

Die Herstellungskosten von DNA-Chips liegen daher bei einigen Hunderttausend Mark. Außerdem, je mehr einzelne Punkte auf einem solchen Chip synthetisiert werden sollen, desto aufwendiger wird die Herstellung der Masken. Im Prinzip kann heute ein solcher Chip deswegen nur in eigens konstruierten Fabriken hergestellt werden. Voraussetzung zur Herstellung solcher Chips ist auch die Installation aller dafür notwendigen Geräte in staubfreien Reinräumen. Es besteht aber ein erheblicher Markt an solchen Chips, die von Firmen und Laboratorien auf ad hoc Basis selber entworfen und hergestellt werden können. Dies verbietet sich nach dem Stand der Technik.

Aufgabenstellung

Das vorgeschlagene erfindungsgemäße Verfahren soll es ermöglichen in Zukunft auf die Etablierung eigener Fabriken für die Herstellung von DNA und PNA-Chips verzichten zu können. Das Verfahren soll den aufwendigsten Schritt der Chipherstellung, die Herstellung und Positionierung der Masken überflüssig machen. Außerdem soll auf Reinräume verzichtet werden können, die Synthese also in jedem Labor möglich werden.

Lösung der Aufgabenstellung

Das erfindungsgemäße Verfahren löst die gestellte Aufgabe auf völlig neuartige Art und Weise durch Kombination kommerziell erhältlicher Komponenten. Im Vergleich zu heute modernen Verfahren verbilligt sich daher die Synthese von DNA- und PNA-Chips um mehrere Größenordnungen. Die Monopolstellung einiger weniger großer Fabriken kann so gebrochen werden und die Herstellung von kostengünstigen DNA-Chips der Allgemeinheit zugänglich gemacht werden.

Das grundlegende Konzept des Verfahrens ist die an sich bekannte Tatsache, daß Flüssigkristall-Matrixen als dynamisch ansteuerbare photolithographische Masken verwendet werden können (Bertsch et al., J. Photochem. & Photobiol. 107, 275-281 (1997)). Diese Technik ist allerdings noch nie auf dem Gebiet der Synthese von biochemischen Polymeren auf Oberflächen eingesetzt oder diskutiert worden.

Unser Verfahren eliminiert die Notwendigkeit sehr viele verschiedene photolithographische Masken herzustellen. Das von uns benutzte Flüssigkristallgitter ist durch aufgedampfte Transistoren an jedem Punkt der Matrix ansteuerbar. Die Auflösung der herzustellenden Chips ist daher nur durch die Zahl der einzeln ansteuerbaren Zellen des Flüssigkristalls abhängig. Jede Maske wird also anstelle einer physikalischen Anordnung von Löchern in einer lichtundurchlässigen Oberfläche durch die rein elektronische Ansteuerung der einzelnen Zellen erreicht. Die Auflösung der

DE 198 23 454 A 1

3

Maske - durch die minimale Größe der einzelnen Zellen limitiert - kann dadurch praktisch unendlich gesteigert werden, daß eine größere Flüssigkristallmatrix verwendet wird als der letztendliche Chip. Das Licht, welches durch diese große dynamische Maske fällt kann dann hinter dieser durch optische Linsen auf die Oberfläche teleskopiert werden. Durch diese Technik kann auch der sonst erfolgende Ausbleicheffekt der Flüssigkristalle verhindert werden: Weniger Licht fällt pro Fläche auf die Flüssigkristalle, als hinter dieser für die Entschätzung auf der Chip-Oberfläche benötigt wird.

Anstelle des nach dem Stand der Technik notwendigen Austauschs von Masken nach jedem Syntheseschritt wird im erfindungsgemäßen Verfahren einfach nur die Ansteuerung des Flüssigkristalls vom Computer geändert. Zwischen den Entschätzungen liegen bei der Synthese chemische Schritte, für welche keine Lichtenergie notwendig ist. Dies findet auch innerhalb der verfahrensgemäßen Vorrichtung statt, ohne daß die Bewegung des Chips oder der Maske notwendig wäre. Durch die starre Anordnung und extrem präzise Positionierung von Chip, Maske und Lichtquelle, werden mechanische Probleme wie die nach dem Stand der Technik oft notwendige Neupositionierung vermieden. Eine verfahrensgemäße Vorrichtung kann also mechanisch sehr einfach ausgelegt sein.

Technisch zeichnet sich eine erfindungsgemäße Vorrichtung dadurch aus, daß Chip-Rohlinge hergestellt werden, welche entweder chemisch aktivierbare Oberflächen (an welche ein beliebiger Nukleotidbaustein gekoppelt werden kann) aufweisen oder schon mit geschützten, photochemisch abspaltbaren Molekülen belegt sind. Solche Moleküle können zum Beispiel direkt einzelne Nukleotide oder PNA Bausteine darstellen, welche in der Produktion gleichmäßig auf der Oberfläche angebracht worden sind. Eine wesentliche Eigenschaft dieser Rohlinge ist deren Verpackung. Diese werden unter Reinbedingungen verschmutzungsfrei hergestellt und so verpackt, daß sie auf eine Art und Weise in die Vorrichtung eingeführt werden können, die jeden Kontakt mit einer nicht gefilterten "normalen" Laborumgebung ermöglicht. Zum Beispiel kann eine solche Verpackung mit einer durchstoßbaren Folie versiegelt werden. Eine derart verpackter Rohling kann durch eine Dichtung in die Vorrichtung eingeschoben werden, wobei der eigentliche Rohling aus der Verpackung herausgedrückt wird, die Folie durchstößt und dann in der eigentlichen Vorrichtung einrastet (Fig. 1). Damit ist die genaue und unverrückbare Positionierung des Rohlings während allen weiteren Schritten gesichert. Außerdem wird Verschmutzung ausgeschlossen.

Nach dem Einrasten kommt ein solcher Rohling unterhalb der Flüssigkristallmatrix zu liegen. Der Rohling bildet so den Boden, die untere Elektrodenplatte der Flüssigkristallmatrix die Decke eines sehr kleinen Hohlraumes, der auch an den Seiten abgedichtet ist. Über mehrere Zuleitungen werden chemische Lösungen in diesen Hohlraum eingeführt und dieser auch luft- oder gasgetrocknet werden. Die Decke des Hohlraumes kann aber auch durch eine andere Fläche als direkt einer der Bestandteile der Flüssigkristallanzeige sein. Zum Beispiel kann dieser aus einem letzten Teil der Optik bestehen, welche das durch die verschiedenen Zellen des Flüssigkristalls durchgelassene Licht fokussieren.

Das im Anspruch beschriebene Verfahren soll aber auch andere technische Ausführungen einschließen.

Die Flüssigkristallmatrix selber besteht in an sich bekannter Art und Weise aus Flüssigkristallen, welcher zwischen zwei planen Schichten eines solchen Materials eingeschlossen werden, welches für die für die Entschätzung wesentlichen Wellenlängen durchlässig ist Wellenlängen, welche

4

nicht spezifisch zur Photoentschätzung beitragen können durch diese Schichten oder andere Teile der Optik absorbiert werden. Besonders kurzwelliges ultraviolettes Licht wird durch diese Schichten absorbiert. Dieses zerstört DNA. Die eine Schicht Material wirkt dabei auch als Elektrode. Auf die andere Schicht werden in der Art Leitungen gelegt, daß die gesamte Matrix definiert durch Zellen, die einzeln elektrisch ansteuerbar sind in ein enges Gitter von Punkten unterteilt ist. Elektrische Anregung führt zu einer Ausrichtung der Flüssigkristalle nur an den definierten Punkten. Dort wird dann Licht absorbiert. Andererseits ist es aber auch möglich, das nur die angeregten Punkte für Licht einer bestimmten Wellenlänge durchlässig werden. Beide Varianten sollen also geschützt werden. Im Prinzip kann die Flüssigkristallmatrix genau die Größe der darunterliegenden Chip-Oberfläche haben. Dann muß Licht mit einem verhältnismäßig parallelen Strahlengang durch eine einfache Lichtquelle auf die Matrix gestrahlt werden. Die Flüssigkristallmatrix kann aber auch beliebig größer sein, als die bestrahlte Oberfläche. In diesem Fall muß zwischen Matrix und Chip eine Optik eingeführt werden, welche das durchscheinende Licht bündelt. Die Vorteile einer solchen Anordnung sind, daß die pro Fläche auf die Matrix einwirkende Energie geringer wird als auf der Chip-Oberfläche. Damit kann der problematische Effekt vermieden werden, welcher bei dauerhafter Bestrahlung die Absorptionseigenschaft der Flüssigkristalle schmälert. Außerdem kann die Zahl der einzelnen Punkte auf der Chip-Oberfläche praktisch beliebig gesteigert werden (Fig. 2).

Die letzte wesentliche Eigenschaft die beschriebenen Verfahrensweisen liegt in den Algorithmen, welche zur Ansteuerung des Flüssigkristallmatrix verwendet werden. Eine nach dem erfindungsgemäßen Verfahren ausgelegte Vorrichtung kann von der Eingabe einer oder vieler Sequenzen, welche durch Hybridisierung einer Ziel-DNA mit dem Chip getestet werden sollen, selbständig operieren. Die Datenverarbeitung kann aus den eingegebenen Sequenzen selbständig die zu synthetisierenden Oligonukleotide errechnen und die Abfolge der zu deren Synthese notwendigen Masken berechnen. Diese werden dann, koordiniert mit den verschiedenen chemischen Reaktionsschritten vollautomatisch während der Synthese durch das Muster der in den einzelnen Entschätzungsschritten an die Matrix angelegten Spannungen umgesetzt.

Im Prinzip kann auch ein Detektor (zum Beispiel eine CCD Kamera) in die Vorrichtung eingebaut werden. Diese kann dann nach einer Hybridisierung Signale an den einzelnen Punkten der Chip-Oberfläche registrieren und auswerten.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren ist zum ersten Mal eine Methode geschaffen worden, welche ein billiges und schnelles Synthetisieren von DNA- oder PNA-Chips ermöglicht, deren Belegung mit Sequenzen vom eigentlichen Bediener individuell festgelegt werden kann. Unser Verfahren revolutioniert die Technologie der DNA-Chips von Grund auf.

Patentansprüche

Verfahren zur photolithographischen Herstellung von Oligonukleotiden auf zweidimensionalen Matrixen zur Produktion von sogenannten DNA-, PNA oder Protein-Chips, dadurch gekennzeichnet, daß als photolithografische Maske eine dynamisch ansteuerbare Flüssigkristallmaske verwendet wird.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

- Leerseite -

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:
Int. Cl. 6:
Offenlegungstag:

DE 198 23 454 A1
C 07 H 21/04
25. November 1999

Fig.1

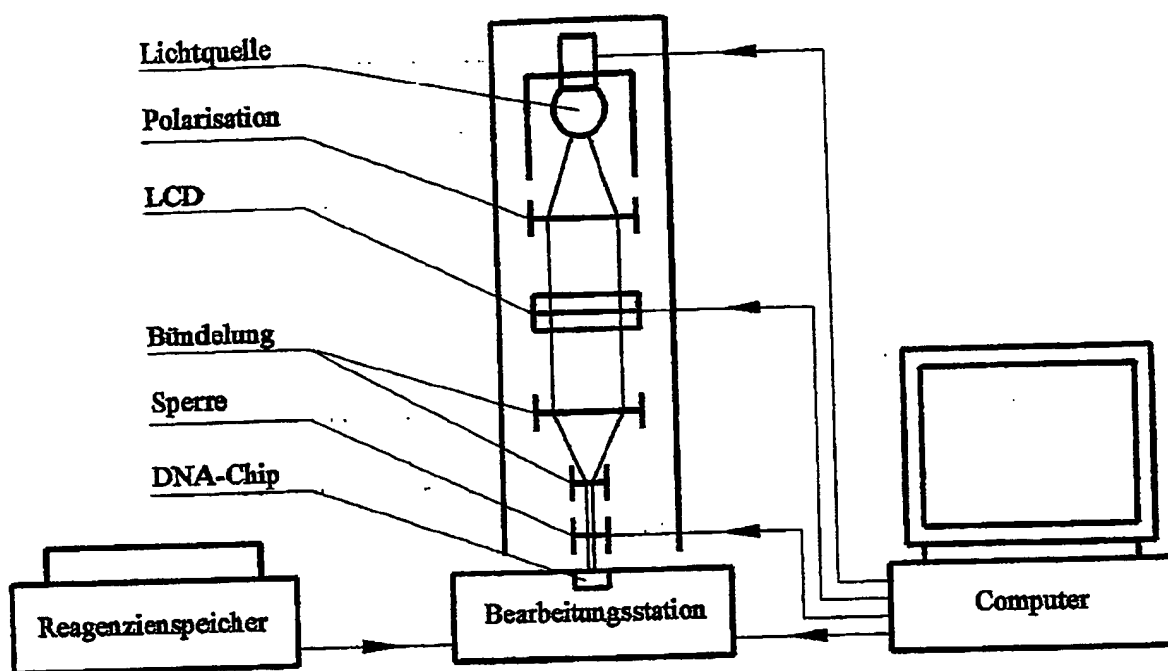


Fig.2

